

A molekuláris genetikai vizsgálatok jelentősége veleszületett immunhiány betegségeiben

**Dr. Maródi László, dr. Erdős Melinda, dr. Tóth Beáta,
dr. Rákóczi Éva**

Debreceni Egyetem OEC Infektológiai és Gyermekimmunológiai
Tanszék.

Bevezetés


Az első veleszületett immunhiány betegséget, az X-kromoszómához kötött agammaglobulinaemiát 1952-ben Ogden Bruton amerikai katonatorvos ismerte fel, aki recidíváló, súlyos fertőzésben szenvedő fiúgyermekben a gammaglobulin csúcs teljes hiányát észlelte a fehérje elektroforézis képen. Az első agammaglobulinaemiás beteg esetének leírását több évtizedes kutatómunka követte, amely közel 150 primer immundeficiencia betegség felismeréséhez vezetett.

Az elmúlt 15 évben a molekuláris genetikai diagnosztika fejlődésének köszönhetően több mint 110 primer immunhiány betegség genetikai hátterét sikerült tisztázni. Az esetek döntő többségében a molekuláris genetikai vizsgálatok segítségével pontos diagnózis állítható fel és új terápiás módszerként egyre nagyobb teret hódít a génterápia is. A genotípus-fenotípus vizsgálatok és az állatkísérletes modellek révén az immunhiány betegségek többségében tisztázható a betegség patomechanizmusa és az érintett génekről átíródó fehérjék funkciója. A nagyléptékű fejlődés ellenére azonban mind a mai napig nem ismert, hogyan vezet, pl. a BTK vagy a WASP gén mutációja X-kromoszómához kötött agammaglobulinaemia illetve Wiskott–Aldrich szindróma kialakulásához. A veleszületett immunhiány betegségek diagnosztikájában elért eredmények a molekuláris genetika fejlődésének egyik legreprezentatívabb bizonyítékai.

Immundeficienciák

Immundefektusnak vagy más néven immundeficienciának, immunhiányos állapotnak, az immunrendszer csökkent, extrém esetben hiányzó működését nevezzük. A defektusok lehetnek primerek, amikor az immunitáshiány az immunrendszer öröklött rendellenességének követke-

ménye, amely különböző fertőzések, allergia, autoimmun és daganatos betegségek kialakulására hajlamosítja az egyént. Immunhiányos-állapotra utalhat a krónikus étvágytalanság, az emésztési és felszívódási zavar, az idült hasmenés, a gyakori hőemelkedés és láz, a somaticus retardatio, a vérzékenység és a súlyos oltási reakció. A legjellemzőbb következmény a gyakran visszatérő, súlyos lefolyású, terápiára rosszul reagáló, változó lokalizációjú, gyakran maradványtünetekkel gyógyuló fertőzések kialakulása. Különös figyelmet érdemelnek az opportunisták, ritkán előforduló kórokozók által okozott recidíváló infekciók, az antibiotikum kezelés mellett is szokatlanul elhúzódó lefolyás vagy az infekciók szövőd-ményeinek szokatlan súlyossága. Az érintett családokban gyakran észlelhető a fertőzésekre való fogékonyság halmozott előfordulása, immundefektus, autoimmun betegség, allergiás hajlam, malignus megbetegedés vagy korai gyermekhalál.

Immunodefektusok	Primer immunodefektusok
Primer immunodeficiencia	<div>  </div>
	B-sejt-defektus (64,7%)
	T-sejt vagy kombinált immunodeficiencia (20,2%)
	Phagocytasejt-defektus (8,7%)
	Komplementdefektus (3,6%)
	Egyéb (2,8%)
Másodlagos immunodeficiencia	
Szerzett immunodeficiencia	
Átmeneti immunodeficiencia	

Gyakorlati szempontból a veleszületett immunhiány betegségek a következő csoportokba sorolhatók: 1. az első viszonylag nagy esetszámú csoportba az antitest illetve a komplement deficienciák tartoznak, amelyek recidív alsó és felső légúti fertőzések kialakulására hajlamosítanak; 2. a T-sejt illetve a kombinált immundeficienciákra a somaticus fejlődés elmaradása, visszatérő hasmenések és opportunisták fertőzések jellemzők; 3. a phagocyták sejt defektusokra a pyogen baktériumok és gombák által okozott nyálkahártya és invazív fertőzések típusosak.

Molekuláris genetikai vizsgálatok primer immundefektusokban

A primer immundeficienciák betegségek klinikailag heterogén körképek. Az immundeficienciák egy része a típusos klinikai tünetek és a jellegzetes kórokozó spektrum alapján egyértelműen felismerhető. Az esetek nagyobb százalékában azonban a humorális és a celluláris immundeficienciák, valamint a komplement defektusok tünettanában átfedések észlelhetők. Mindezek miatt a pontos diagnózis megállapításához a részletes anamnézis, a fertőzések etiológiájának, lefolyásának, típusának, lokalizációjának gondos elemzése, az ismételten elvégzett fizikális vizsgálat, a rutin laboratóriumi vizsgálatok és az in vivo és in vitro immunológiai tesztek sokszor nem elegendőek; az egyértelmű diagnózishoz genetikai vizsgálatra is szükség van.

Napjainkban az immundeficienciák molekuláris genetikai kutatásában robbanásszerű fejlődés észlelhető. Egy évtizede még alig néhány immundeficientia gén volt ismert, napjainkban azonban egyre több immundeficientia esetén tisztázható a háttérben álló betegségi gén. Csak 2003-ban 13 különböző, primer immunhiányos betegség genetikai hátterét sikerült tisztázni. A jelenleg ismert, több mint 110 immundeficientia gén felismerése hozzájárult a veleszületett és az adaptív immunrendszer fejlődésének és szabályozásának jobb megértéséhez.

Az immunhiányos állapotok korai felismerésében – bár alacsony incidenciájú megbetegedésekről van szó – a genetikai szűrővizsgálatoknak óriási jelentősége van. A korai, biztos diagnózis lehetővé teszi a fertőzések kialakulásának megelőzését és korai adekvát immunterápiáját, a genetikai tanácsadást, a hordozóállapot kiszűrését, a prenatális diagnózist. A PID-ben szenvedő betegek esetén a gén szintű diagnosztika a következők miatt nem nélkülözhető:

1. A molekuláris genetikai vizsgálatok megerősíthetik a feltételezett diagnózist, ami különösen akkor fontos, ha a laboratóriumi leletek és a klinikai kép a klasszikustól, a megszokottól eltérő, szokatlan.

2. A genetikai vizsgálatok segítségével fény derülhet az immunregulatio addig még ismeretlen részleteire és tisztázható az immunhiányos betegség patomechanizmusa.

3. A PID által érintett családokban a prenatális genetikai vizsgálatok óriási jelentőségét a családtervezésben nem kell hangsúlyozni.

A primer immundefektusok lényegesen gyakoribbak, mint azt korábban gondoltuk. Ma már több mint 150 különböző immunhiányos betegség ismert, amelyek száma a genetikai kutatások nagymértékű fejlődésével

egyre gyarapszik. A leggyakoribb primer immundefektus, a szelektív IgA hiány előfordulási gyakorisága 1:500 és legalább ilyen arányban az immunhiányos betegségek nem kerülnek felismerésre, vagy téves diagnózis születik. A becsült gyakoriság tehát Magyarországon 1:250. Ezek a számadatok is megerősítik, hogy ezekre a betegekre különösen nagy figyelmet kell fordítanunk. A mutáció analízissel diagnosztizálható primer immundefektusok száma ma már több mint 110. Laboratóriumunkban 2003-ig döntően a humorális és a celluláris immunválasz felmérésére alkalmas funkcionális, immunkémiai és biokémiai módszereket alkalmaztunk. A korszerű diagnosztikai feltételek biztosítása szükségessé tették molekuláris genetikai vizsgálómódszerek beállítását is. A Magyar Gyermekimmunológiai Munkacsoport 2002-es konferenciáján megfogalmazódott az igény, hogy Magyarországon legalább egy helyen létre kell hozni immundeficientia molekuláris genetikai központot. A nagy várakozást követően, 2003-ban Tanszékünkön létrejött molekuláris genetikai laboratórium országos igényt igyekszik kielégíteni, hiszen laboratóriumunkban a hagyományos vizsgálómódszereken kívül a mutáció analízis és más molekuláris genetikai vizsgálatok elvégzése is biztosított. A ritka, öröklődő primer immundeficientiában szenvedő betegek és családtagjaik számára laboratóriumunkban a prénatalis genetikai diagnosztika is hozzáférhető, így lehetőségünk van arra is, hogy a családtervezésnél felmerülő fontos kérdésekre választ adjunk.

Az esetek egy kis részében a genomikus DNS vizsgálata sem mindig elegendő, hiszen ugyanaz a fenotípus nem egyszer különböző gén-defektusok következménye is lehet; sőt, ugyanaz a génmutáció sokszor egy családon belül is teljesen eltérő fenotípusos megjelenést eredményez. Ezen genotípus-fenotípus megfigyelések további kutatásokra ösztönöznek, elsősorban a környezeti és más genetikai faktorok pontos szerepének tisztázására és a gének szerkezete és funkciója közötti összefüggések pontosabb megismerésére.

Konklúzió

Az elmúlt évtizedben a molekuláris genetika területén robbanásszerű fejlődésnek lehettünk szemtanúi, amely számos korábban misztikusnak vélt immunhiányos betegség patomechanizmusának megértéséhez vezetett. A közelmúltban több primer immundeficientia molekuláris genetikai alapjait sikerült tisztázni, így fény derült a rövid végtagú törpeség, az X-kromoszómához kötött IPEX szindróma, a NEMO deficiencia, a leukocyta adhézis deficiencia II. típusa és a fokozott radioszenzitivitással tár-

suló SKID hátterére. Bár a klinikai szintű manifesztációkat nem minden esetben tudjuk egy jól meghatározott molekuláris eseményhez kötni, a klinikai immunológiai megfigyelések és az immunológiai alapkutatások molekuláris szintű eredményeinek folyamatos összevetése mindkét oldal számára gyümölcsöző lehet. A primer immundeficienciák hasznos modellként szolgálhatnak a jövő kutatásaiban, az autoimmun vagy az allergiás immunpatomechanizmusú, multifaktoriális betegségek tanulmányozására is.

Ha a tünetek hátterében hereditér betegség lehetősége is felmerül, a családi anamnézis mellett, a családfakészítésnek is az első diagnosztikus lépések között kell szerepelnie. Bár a legtöbb öröklött immundeficientia genetikai szintű leírására csak a közelmúltban került sor, a családfák és a családtagok anamnézisének pontos elemzése, az esetek többségében segít feltérképezni a korábbi generációk érintett családtagjait, akiknek a klinikai tünetei, kórlefolyása a betegével megegyező. A precíz adatgyűjtés, a távoli rokonok felkutatása természetesen időigényes feladat és rendszerint több családlátogatást igényel, mint csak a beteg közvetlen hozzátartozóival való elbeszélgetést. A családtagok korábbi zárójelentéseinek, orvosi dokumentációjának áttekintése is hasznos lehet.

Az immunológiai alapkutatások és a genetikai szűrővizsgálati módszerek és műszerek fejlődése, az immunrendszer számos betegségének molekuláris szintű megértéséhez vezetett. Az immunbiológia területén növekvő tudásunk egyben lehetőséget teremtett új terápiás eljárások bevezetésére, nemcsak az immundeficienciák, hanem különböző autoimmun-, gyulladásos-, illetve transzplantációhoz kapcsolódó betegségekben is. Az immundeficienciák molekuláris kutatása területén tapasztalható hatalmas fejlődés ellenére maradtak kihívások. Ezen lehetséges kihívások egyike a mutáns gén korrekciója összejt transzfekcióval. A primer immunhiány betegségekben, a génterápiás próbálkozások kezdeti eredményei biztatónak tűnnek, és remény van arra, hogy a génterápia hamarosan az első vonalbeli terápiás eljárások között szerepeljen.

Esetismertetés

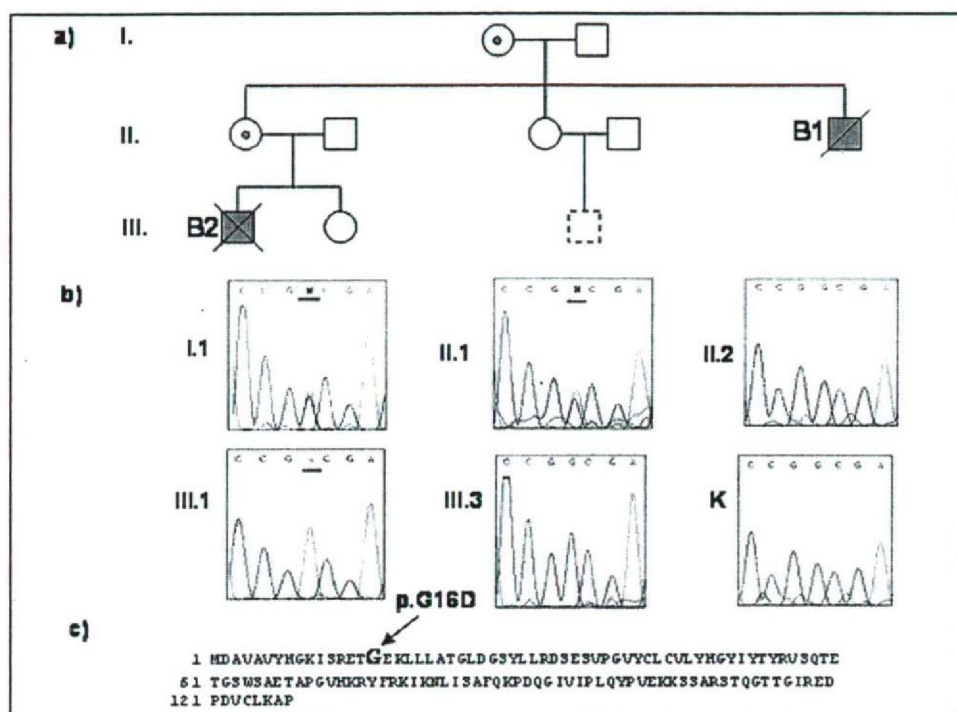
X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség

A kilenc éves fiúgyermeket (B1), nyolc hónapos korában kezelték először kórházban pneumonia és hypochrom anaemia miatt. Kilenc éves koráig egészséges volt, ekkor pharyngitis, hepatosplenomegalia, lympho-

denopathia, légzési elégtelenség, sárgaság és bágyadság miatt igényelt hospitalizációt. Tízórás ápolás után gyorsan progrediáló májelégtelenség, shock, agyi oedema és beékelődés következtében exitált. Szérumában az anti-EBV IgM titer emelkedett volt. A szövettani vizsgálatok a májban, a lépben és a tüdőben diffúz, atípusos lymphocytás és plazmasejtes infiltrációt igazoltak. A nyirokcsomók thymus-dependens területén a lymphocyták jelentős mértékű depleciója volt látható.

A beteg unokaöccsének (B2) kórházi felvétele nyolc hónapos korában kéthetes hurutos panaszok, láz, pharyngitis, hepatosplenomegalia, maculopapularis exanthemák és generalizált lymphadenopathia miatt vált szükségessé. Gyors progressziót mutató májelégtelenség és légzési distress miatt gépi lélegeztetést igényelt, de az intenzív kezelés ellenére a felvételét követő 4. napon exitált. A szövettani vizsgálatok a májban, a csontvelőben és a központi idegrendszer területén diffúz, T- és plazmasejtes infiltrációt igazoltak. A lymphocyt marker vizsgálatok a nyirokcsomókban és a májban a CD8⁺ T lymphocyták dominanciáját és intakt B-sejtes területeket mutattak.

A súlyos klinikai kép és a szövettani vizsgálatok eredménye alapján *SH2D1A* gén mutációjának lehetősége merült fel. A betegek családtagjainak perifériás véréből genomikus DNS-t izoláltunk és az *SH2D1A* génmutáció analízis vizsgálatát végeztük el. Először a B2 beteg édesanyját (II.1) és anyai nagymamáját (I.1) vizsgáltuk, akik az 1. exon, c.47G>A mutációjára nézve heterozigótának bizonyultak. Ugyanezt a mutációt a B2 beteg nyirokcsomó szövettani blokkjából izolált genomikus DNS-ben is igazoltuk. Bár a B1 beteg mutáció analízis vizsgálatára nem volt lehetőségünk, a klinikai kép, az X-kromoszómához kötött öröklődés és a szövettani eltérések alapján feltételeztük, hogy ő is az unokaöccsében igazolt mutációt hordozta. A család kivizsgálása közben a B2 beteg nagynénje (II.2) várandós lett és a magzati nem meghatározás fiú magzatot (III.3) igazolt. Az édesanya és a fetus a mutációra nézve vad típusúnak bizonyult. A SAP protein p.G16D aminosav cseréhez vezető c.47G>A mutációja XLP betegek között korábban még nem volt ismert, ezért a mutáns fehérje patogenetikai szerepének igazolására további vizsgálatokat végeztünk.



1. ábra.

X-kromoszóma-hoz kötött lymphoproliferatív betegségben szenvedő beteg családfája és a család molekuláris genetikai vizsgálatának eredményei.

a) A betegek családfája. Szürke négyzetek, fiú betegek fatális infekciós mononucleosissal; áthúzás, meghalt betegek; szaggatott négyzet: fiúmagzat; B, beteg.

b) A genomiális DNS szekvenálás eredményeit jelző elektroforegrammokon az *SH2D1A* gén, 1. exonján a B2 (III.1) beteg esetén c.47G>A mutációt látunk és a vad típusú szekvenciát a kontrollnál (K); a mutáció helyét aláhúzással jelöltük. Az elektroforegrammok az anyai nagymama (I.1) és az édesanya (II.1) esetén heterozigóta állapotot, az édesanya testvérében (II.2) és a fiúmagzatban (III.3) vad típust mutatnak.

c) A SAP protein aminosav szekvenciája A mutáció helyét nyillal jelöltük